

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 09 October 1997 (09.10.97)	
International application No.: PCT/JP97/01084	Applicant's or agent's file reference: E3244-00
International filing date: 28 March 1997 (28.03.97)	Priority date: 29 March 1996 (29.03.96)
Applicant: SAITO, Shuji et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
24 July 1997 (24.07.97)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

(TRANSLATION)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference E3244-00	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div>FOR FURTHER ACTION</div><div>see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA220) as well as, what applicable, item 5 below.</div></div>
International application No. PCT/JP97/01084	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div>International Filing date (<i>day/month/year</i>) 28.03.97</div><div>(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 29.03.96</div></div>
Applicant: Nippon Zeon Co., Ltd.	

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).
2. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).
3. ☒ The international application contains disclosure of a nucleotide and/or amino acid sequence listing and the international search was carried out on the basis of the sequence listing.

☒ filed with the international application.
☐ furnished by the applicant separately from the international application,

☐ but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed.
☐ transcribed by this Authority.
4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. The figure of the drawings to be published with the abstract is:

Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.
☐ because the applicant failed to suggest a figure.
☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

特 許 協 力 条 約

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D	15 MAY 1998
WIPO	PCT

出願人又は代理人 の書類記号 E3244-00	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 97/01084	国際出願日 (日.月.年) 28.03.97	優先日 (日.月.年) 29.03.96
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ° C07K 14/30, 14/055, 14/065, C12N 15/31, 15/38, 15/62, C12N 7/01, A61K 39/255 // C12P 21/02, (C12P 21/02, C12R 1:92)		
出願人 (氏名又は名称) 日本ゼオン株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。	
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。	
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見	

国際予備審査の請求書を受理した日 24.07.97	国際予備審査報告を作成した日 22.04.98	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 印 	4 B 9358
電話番号 03-3581-1101 内線 3449		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1994年1月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | |
|--------------------------|-------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時のもの |
| | 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | | | |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| | 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| | 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図

3. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見(必要ならば)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性（N）

請求の範囲

1-13

有

請求の範囲

無

進歩性（IS）

請求の範囲

有

請求の範囲

1-13

無

産業上の利用可能性（IA）

請求の範囲

1-13

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明

引用文献1：WO, 94/23019, A（日本ゼオン株式会社）13日. 10月. 1994（13. 10. 94）
&AU, 9462926, A &EP, 692532, A

引用文献2：YOSHIDA, Shigeto et al. "The glycoprotein B genes of Marek's disease virus serotypes 2 and 3: identification and expression by recombinant fowlpox virus", Virology (1994) 第200巻, 第2号 p. 484-493

・請求の範囲第1-4項について

国際調査報告で引用した上記引用文献1には、マイコプラズマ・ガリセプティカム（MG）の抗原性を有するポリペプチドのN末端側に、鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質のシグナル膜アンカーを連結させた融合ポリペプチドが記載されている。また、該融合ポリペプチドを抗MG感染症ワクチンとして使用すること、並びに、該融合ポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換えフowlポックスウイルス（FPV）を生ワクチンとして使用することが記載されている。さらに、シグナル膜アンカーをコードするDNAは、タイプII外膜タンパク質のN末端側の疎水性ペプチド領域をアミノ酸配列により解析することにより見いだすことができると記載されている。

一方、引用文献2には、マレック病ウイルス（MDV）由来gBタンパク質が記載されている。また、引用文献2には該gBタンパク質のシグナル配列部位についても記載されている。さらに、引用文献2には、該gBタンパク質をコードするDNAを組み込んだ組換えFPVをワクチンとして使用することも記載されている。

ここで、MDV由来gBタンパク質は鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質であるから、引用文献1に記載の融合タンパク質を調製するにあたり、引用文献2のMDV由来gBタンパク質を鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質として採用することは当業者が容易に想到し得たものと認められる。その際に、シグナル膜アンカー部位についても、引用文献1の記載に従って、当業者が容易に決定し得たものと認められる。

そして、本願請求の範囲第1項に係る発明の構成を採ることにより、引用文献1及び2の記載から、当業者が予測できない効果が奏せられるものとも認められない。

したがって、本願請求の範囲第1項に係る発明は、引用文献1及び2の記載に基づいて、当業者が容易になし得たものと認められる。

同様の理由により、請求の範囲第2、3及び4項に係る発明は、引用文献1及び2の記載に基づいて、当業者が容易になし得たものと認められる。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V. 2. 欄の続き

・請求の範囲第 5 - 8 項について

上述の融合タンパク質を抗MG感染症ワクチンとして使用するにあたっては、該融合タンパク質を構成するMDV由来gBタンパク質部分は免疫原性を有する必要がないので、適宜増減可能である。その際に、MDV由来gBタンパク質のシグナル配列部分のみとすることは当業者が必要に応じて適宜なし得たことである。

そして、本願請求の範囲第 5 項に係る発明の構成を採ることにより、引用文献 1 及び 2 の記載から、当業者が予測できない効果が奏せられるものとも認められない。

したがって、本願請求の範囲第 5 項に係る発明は、引用文献 1 及び 2 の記載に基づいて、当業者が容易になし得たものと認められる。

同様の理由により、請求の範囲第 6、7 及び 8 項に係る発明は、引用文献 1 及び 2 の記載に基づいて、当業者が容易になし得たものと認められる。

・請求の範囲第 9 - 12 について

上述したように、請求の範囲第 1 - 8 項の融合タンパク質に係る発明が引用文献 1 及び 2 の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認められ、かつ、引用文献 1 に組換えFPVを生ワクチンとして使用することが記載されている以上、請求の範囲第 9 - 12 項に係る発明も、引用文献 1 及び 2 の記載に基づいて、当業者が容易になし得たものと認められる。

・請求の範囲第 13 項について

多価組換えウイルス生ワクチンは、本願優先日前、当業者の周知技術であったと認められるから、引用文献 1 及び 2 の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認められる組換えウイルス生ワクチンを、FPV、MG及びMDVに対する 3 価ワクチンとして使用することは、当業者が必要に応じて適宜なし得たことである。

62
T-T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT OCT 25 1999

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

09/147052

16C1

Applicant's or agent's file reference E3244-00	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP97/01084	International filing date (day/month/year) 28 March 1997 (28.03.1997)	Priority date (day/month/year) 29 March 1996 (29.03.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/30, 14/055, 14/065, C12N 15/31, 15/38, 15/62, C12N 7/01, A61K 39/255 // C12P 21/02, (C12P 21/02, C12R 1:92)		
Applicant NIPPON ZEON CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 24 July 1997 (24.07.1997)	Date of completion of this report 22 April 1998 (22.04.1998)
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/01084

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages _____, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/01084

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Cited document 1: WO, 94/23019, A (Nippon Zeon Co., Ltd.), 13 October, 1994 (13.10.94) & AU, 9462926, A & EP, 692532, A

Cited document 2: YOSHIDA, Shigeto et al., "The glycoprotein B genes of Marek's disease virus serotypes 2 and 3: identification and expression by recombinant fowlpox virus", Virology (1994), Vol. 200, No. 2, p. 484-493

Concerning claims 1-4

Said document 1 cited in the ISR discloses a fused polypeptide in which a signal membrane anchor of a type II envelope protein of a virus acting to infect Aves is linked on the N-terminal side of a polypeptide having the antigenicity of Mycoplasma gallisepticum (MG). Furthermore, said document 1 discloses the use of said fused polypeptide as an anti MG infectious disease vaccine and the use of a recombinant fowlpox virus (FPV) having a DNA coding for said fused polypeptide integrated, as a live vaccine. Moreover, it is disclosed that a DNA coding for the signal membrane anchor can be found by analyzing the hydrophobic peptide region on the N terminus side of the type II envelop protein in reference to an amino acid sequence.

Document 2 discloses a gB protein derived from Marek's disease virus (MDV), as well as the signal sequence region of said gB protein. Furthermore, document 2 discloses the use of a recombinant FPV having a DNA coding for said gB protein integrated, as a vaccine.

Since the MDV-derived gB protein is the type II envelop protein of a virus acting to infect Aves, it could easily have been conceived by a person skilled in the art to adopt the MDV-derived gB protein in document 2 as the type II envelop protein of a virus acting to infect Aves, for producing the fused protein disclosed in document 1. In this case, the signal membrane anchor region could easily have been determined by a person skilled in the art based on the disclosure in document 1.

Furthermore, the constitution feature of the invention in claim 1 of the present application is not found to provide any effect which cannot be predicted by a person skilled in the art from the disclosures in documents 1 and 2.

Therefore, the subject matter of claim 1 in the present application could easily have been conceived by a person skilled in the art based on the disclosures in documents 1 and 2.

For the same reason, the subject matters of claims 2-4 could easily have been conceived by a person skilled in the art based on the disclosures in documents 1 and 2.

Concerning claims 5-8

When said fused protein is used as an anti MG infectious disease vaccine, since the MDV-derived gB protein portion as a component of the fused protein is not required to have immunogenicity, it can be increased or decreased as required. In this case, it could have been achieved by a person skilled in the art as required, to secure only the signal sequence portion of the MDV-derived gB protein.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/01084

Continuation of box V

Furthermore, the constitution feature of the invention in claim 5 of the present application is not found to provide any effect which cannot be predicted by a person skilled in the art from the disclosures in documents 1 and 2.

Therefore, the subject matter of claim 5 in the present application could easily have been conceived by a person skilled in the art based on the disclosures in documents 1 and 2.

For the same reason, the subject matters of claims 6-8 could easily have been conceived by a person skilled in the art based on the disclosures in documents 1 and 2.

Concerning claims 9-12

As disclosed above, the subject matters of claims 1-8 concerning the fused protein could easily have been conceived by a person skilled in the art based on the disclosures in documents 1 and 2, and document 1 discloses the use of a recombinant FPV as a live vaccine. Hence, the subject matters of claims 9-12, similarly, could easily have been conceived by a person skilled in the art based on the disclosures in documents 1 and 2.

Concerning claim 13

A polyvalent recombinant virus live vaccine must have been a well-known art for a person skilled in the art before the priority date of the present application. The use of the recombinant virus live vaccine, which could easily have been produced by a person skilled in the art based on the disclosures in documents 1 and 2, as a trivalent vaccine for FPV, MG and MDV could easily have been conceived as required by a person skilled in the art.

PCT

国際調査報告



E P

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 1 8 条、PCT 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 E 3 2 4 4 - 0 0	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 9 7 / 0 1 0 8 4	国際出願日 (日.月.年) 2 8 . 0 3 . 9 7	優先日 (日.月.年) 2 9 . 0 3 . 9 6
出願人 (氏名又は名称) 日本ゼオン株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。
3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☒ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
 - ☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。
5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
 - ☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、
第 ____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
 - ☐ 出願人は図を示さなかった。
 - ☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C07K 14/30, 14/055, 14/065, C12N 15/31, 15/38, 15/62,
C12N 7/01, A61K 39/255 // C12P 21/02, (C12P 21/02, C12R 1:92)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 15/00 - 15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 94/23019, A (日本ゼオン株式会社) 13日. 10月. 1994 (13. 10. 94) &AU, 9462926, A &EP, 692532, A	1-13
Y	YOSHIDA, Shigeto et al. "The glycoprotein B genes of Marek's disease virus serotypes 2 and 3: identification and expression by recombinant fowlpox virus", Virology (1994) 第200巻, 第2号 p. 484-493	1-13
Y	NAZERIAN, K. et al. "Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus", Journal of virology (1992) 第66巻, 第3号 p. 1409-1413	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 06. 97

国際調査報告の発送日

01.07.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 7-503843, A (ヴァイロジェネティクス コーポレイション) 27日. 4月. 1995 (27: 04. 95) &WO, 93/14219, A &AU, 9334353, A &EP, 623172, A	1-13
A	JP, 5-504253, A (ブリテイッシュ・テクノロジー・グループ・リミテッド) 8日. 7月. 1993 (08. 07. 93) &EP, 408301, A &GB, 2233655, A &WO, 91/00911, A &AU, 9059555, A	1-13

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 14/30, 14/055, 14/065, C12N 15/31, 15/38, 15/62, 7/01, A61K 39/255 // C12P 21/02, (C12P 21/02, C12R 1:92)	A1	(11) 国際公開番号 WO97/36924 (43) 国際公開日 1997年10月9日(09.10.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01084 (22) 国際出願日 1997年3月28日(28.03.97) (30) 優先権データ 特願平8/103548 1996年3月29日(29.03.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本ゼオン株式会社(NIPPON ZEON CO., LTD.)(JP/JP) 〒100 東京都千代田区丸の内2丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 斉藤修治(SAITO, Shuji)(JP/JP) 津崎芳成(TSUZAKI, Yoshinari)(JP/JP) 柳田 昇(YANAGIDA, Noboru)(JP/JP) 〒210 神奈川県川崎市川崎区夜光1-2-1 日本ゼオン株式会社 総合開発センター内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: NOVEL FUSED PROTEIN, GENE THEREFOR, RECOMBINANT VECTOR, RECOMBINANT VIRUS, AND ITS USE (54)発明の名称 新規な融合タンパク質、その遺伝子、組み換えベクター、及び組み換えウイルスとその利用 (57) Abstract A recombinant virus that is more potent as an antimycoplasma vaccine is provided by preparing a DNA encoding a fused protein comprising a polypeptide having the antigenicity of <i>Mycoplasma gallisepticum</i> and a polypeptide derived from the outer membrane protein of a herpesvirus, wherein the latter polypeptide is connected to the N-terminal side of the former polypeptide, and integrating the prepared DNA into a region non essential for the proliferation of avipoxviruses to prepare a recombinant avipoxvirus.		

(57) 要約

マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドとヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドとを含む融合タンパク質であって、外膜タンパク質由来のポリペプチドがマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドのN末端側に連結していることを特徴とする融合タンパク質をコードするDNAを作製し、これをアビボックスウイルスの増殖に非必須な領域に組み込んで組み換えアビボックスウイルスを作製して抗マイコプラズマワクチンとしてより強力な組み換えウイルスを提供する。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明 細 書

新規な融合タンパク質、その遺伝子、組み換えベクター、及び組み換えウイルスとその利用

5

技術分野

本発明は、マイコプラズマ・ガリセプティカム抗原性ポリペプチドとヘルペスウイルス属外膜タンパク質由来のポリペプチドとの融合タンパク質、当該融合タンパク質をコードするハイブリッドDNA、及び当該ハイブリッドDNAを含有

10 する組み換えアビボックスウイルスと、それを利用したワクチンに関する。

背景技術

マイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*; 以下、MGという) は鶏を含む家禽の産卵率低下や孵化率低下の原因菌であり、全世界に広く蔓延しており、養鶏業界に多大なる

15 被害を及ぼしている。現在、その予防方法として不活化ワクチンや生ワクチンが利用されているが、前者の場合は接種方法が煩雑であったり、免疫持続期間が短く、高価であるなどの欠点がある。後者は、他の生ワクチンの併用によって予期せぬ疾病が現れる欠点がある。また、不活化ワクチン、生ワクチンともにMG感染の迅速な検出方法であるMG凝集反応を使えないデメリットがある。

20 そこで、MGの感染防御抗原タンパク質などの、MG由来のタンパク質を遺伝子工学的技術で生産させてワクチンとして利用することが期待されている。

MG抗原の遺伝子工学的製造は、大腸菌や酵母を用いた系 (特開平2-111795公報など) では、発現させるタンパク質の種類によっては発現量が少ない他、宿主由来のタンパク質の混入や発熱性物質の除去が難しいなどの問題が指摘

25 されている。このため、組み換えウイルスを用いた抗原タンパク質の製造や組み換え生ワクチンの研究が進められている。

組み換えウイルスによる異種遺伝子の発現例は、多くの場合、真核生物の遺伝子もしくはウイルス遺伝子を発現させているため、糖鎖の付加や発現様式などが感染細胞のタンパク発現メカニズムと同じで、*in vivo*における発現タン

パク質に対する抗体価の誘導が比較的容易であった。しかし、原核生物遺伝子を組み換えウイルスで発現させた例は少なく、真核生物との発現様式の違いから効果的に特異抗体を誘導するとは言い難かった (Austinら、Protein Targeting and Selection、Oxford Univ. Press. (1991))。

また、MGに関しては、当該タンパク質をコードする遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスは、特開平5-824646号公報、特開平7-133295号公報、WO94/23019号公報等で知られている。なかでも、WO94/23019号公報には、ニューカッスル病ウイルス (以下、NDVという) のHN遺伝子のシグナル膜アンカー部分の遺伝子とMG抗原遺伝子を繋げてウイルス膜アンカー領域を持つMG抗原タンパク質を発現する組み換えウイルスを、組み換え生ワクチンとして接種するとMG抗原遺伝子単独を発現する組み換えウイルスより効率よく抗体を誘導することが確認されている。

しかしながら、この程度では十分なワクチン効果は必ずしも期待できない。

従って、さらに抗原認識性を上げる方法を見出すことが、効果的な抗MG感染症用ワクチンの開発に急務である。

ところで、外膜タンパク質は、前述したNDV以外にも、ヘルペスウイルス属などにおいても、外膜タンパク質が知られている。例えば、単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質B (gB)、C (gC)、D (gD)、H (gH)、I (gI) やマレック病ウイルス (以下、MDVという) の単純ヘルペスウイルス糖タンパク質gB、gC、gD、gH、gIに相当するgBh、gCh、gDh、gHh、gIh、及び上記タンパク質とホモロジーを有するヘルペスウイルス属のタンパク質などは、その塩基配列やアミノ酸配列も知られている。また、これらのタンパク質の一部は単純ヘルペスウイルスの中和抗体を誘導する事が知られている

(Delucaら、Virology、122、411-423 (1982))。また、これらのタンパク質をコードする遺伝子をワクシニアウイルスに組み込んで、発現させることにより中和抗体を誘導する事も知られている

(Blacklawsら、Virology、177、727-736 (1990))。

しかしながら、これらヘルペスウイルス属の外膜タンパク質のシグナル配列を活用することは十分に検討されていなかった。

発明の開示

本発明者らは、かかる従来技術の下で、高い感染防御活性を有するマイコプラズマ抗原タンパク質を大量に発現し、宿主側に高度に抗原認識させることのできる組み換えウイルスを得るべく鋭意努力した結果、ヘルペスウイルス属の外膜タンパク質DNAにマイコプラズマ抗原タンパク質DNAを連結させたハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスを、宿主に感染させることにより宿主側の抗原認識能を飛躍的に向上させ得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

かくして本発明によれば、マイコプラズマ・ガリセプティカム抗原性を有するポリペプチド（以下、マイコプラズマ由来のポリペプチドということがある）とヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチド（以下、ヘルペスウイルス由来のポリペプチドということがある）とを含む融合タンパク質であって、外膜タンパク質由来のポリペプチドがマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドのN末端側に連結していることを特徴とする融合タンパク質、当該融合タンパク質をコードするハイブリッドDNA、当該ハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルス、および当該組み換えアビボックスウイルスを有効成分とする生ワクチンが提供される。

20 図面の簡単な説明

図1はpNZ40K-Sの構築手順を説明する図である。

図2はpNZ40K-Sの構築手順を説明する図である。

図3はpNZ40K-Sの構築手順を説明する図である。

図4はpNZ40K-Cの構築手順を説明する図である。

25 図5はpNZ40K-Cの構築手順を説明する図である。

図6はpNZ40K-Cの構築手順を説明する図である。

図7はTTM-1ポリペプチドの発現を確認した結果を示すウェスタンブロットの図である。

図8は気管病変スコアを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

(マイコプラズマ由来のポリペプチドとその遺伝子)

ここで、マイコプラズマ由来のポリペプチドとは、MG免疫血清またはMG感染血清と抗原抗体反応を呈し、MGに由来する抗原タンパク質であるが、これらは天然のマイコプラズマ・ガリセプティカムが発現するタンパク質そのものである必要はなく、例えば1または2以上のアミノ酸が自然に、または人工的に例えば位置特異的変異など公知の手法(特公平6-16709号公報など)により欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾を受けているタンパク質であってもよい。もちろんこのような変異によっても抗原性を示すエピトープが含まれていることは必要である。尚、エピトープ領域の決定は、ペプスキューン法に基づく

Geysenらの方法(J. Immunol. Meth.、102、259-274(1987))、Hoppらの方法(Proc. Natl. Acad. USA、78、3824-3828(1981))、Chouらの方法(Advances in Enzymology 47、145-148(1987))など公知の方法を用いることができる。

このような抗原性を有するペプチドの具体例として特開平2-111795号公報(米国特許出願シリアル番号359、779号、米国特許出願シリアル番号07/888、320号、米国特許出願シリアル番号08/299、662号)、特開平5-824646号公報(米国特許第5、489、430号公報)、WO 94/23019号公報(米国特許出願シリアル番号08/525、742号、特表平6-521927号公報)に記載された抗原タンパク質やそのタンパク質のアミノ酸配列を含むマイコプラズマ・ガリセプティカムのタンパク質などが例示され、もちろん、エピトープが含まれる限りこれらの一部であってもよい。

これらのなかでも、特開平5-824646号公報に記載されている約40キログルトンのポリペプチド、特表平6-521927号公報に記載されている約66キログルトンのTM-66遺伝子によってコードされたポリペプチド(当該公報の配列番号16)や約67キログルトンのTM-67遺伝子によってコードされたポリペプチド(当該公報の配列番号27)などが好ましい。

本発明においてマイコプラズマ由来のポリペプチドの遺伝子は、上述したマイ

コプラズマ・ガリセプティカム抗原性を有するポリペプチドをコードするDNA配列を含むものであり、このようなDNAは、合成するか、または天然のマイコプラズマ・ガリセプティカムに属する細菌（具体例としてはR株、S 6株、K P-1 3株、P G 3 1株など）などから得ることができる。野外から分離された

5 MG由来のDNAでもよい。もちろん、これらの遺伝子を公知の手法（Methods in Enzymologyなど）により欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾をしてもよい。

（ヘルペスウイルス由来のポリペプチドとその遺伝子）

本発明で言うヘルペスウイルス由来のポリペプチドとは、ヘルペスウイルス属

10 ウイルスのエンベロープを構成するタンパク質由来のポリペプチドであるが、このタンパク質の全長である必要はなく、融合タンパク質として細胞膜に呈示させることのみを目的とする場合は、膜アンカーとシグナル配列を含み、分泌を目的とする場合などはシグナル配列のみであってもよい。また、外膜タンパク質はタイプI外膜タンパク質、タイプIIの外膜タンパク質のどちらでもよく、そのシ

15 グナル配列、膜アンカー配列はアミノ末端もしくはカルボキシル末端の疎水性ペプチド領域のアミノ酸配列を解析する事により、容易に見いだすことが可能である。

外膜タンパク質の具体例としては、例えば、単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質g B、g C、g D、g H、g Iやマレック病ウイルス（以下、MDVという）

20 の単純ヘルペスウイルス糖タンパク質g B、g C、g D、g H、g Iに相当するg B h、g C h、g D h、g H h、g I h、及び上記タンパク質とホモロジーを有するヘルペスウイルス属のタンパク質等が挙げられる。

もちろん、外膜タンパク質のシグナル配列以外のエピトープを含むポリペプチドを前記抗原性を有するポリペプチドに連結させれば、このエピトープが生体内

25 で生体に免疫を付与することも期待できる。

本発明においてマイコプラズマ由来のポリペプチドの遺伝子は、上述したヘルペスウイルス由来のポリペプチドをコードするDNA配列を含むものであり、このようなDNAは、合成するか、または天然のヘルペスウイルスから得ることができる。もちろん、これらの遺伝子を公知の手法（Methods in

Enzymologyなど)により欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾をしてもよい。

(融合タンパク質とハイブリッドDNA)

本発明の融合タンパク質は、後述するハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビポックスウイルスを鶏胎児線維芽細胞(以下、CEF細胞という)や発育鶏卵しょう尿膜細胞などにて培養し得ることができる。

得られた融合タンパク質は、コンポーネントワクチンとして用いることも可能である。

本発明のハイブリッドDNAは、上記該マイコプラズマ由来のポリペプチドの遺伝子とヘルペスウイルス由来のポリペプチドの遺伝子とが直接、又は任意のDNA配列を介して連結されたものである。

このハイブリッドDNAは、常法、例えばヘルペスウイルスの外膜タンパク質をコードするDNAまたは外膜タンパク質のシグナル配列をコードするDNAと、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質をコードするDNAとが結合可能な制限酵素切断断片となるようにし、両者をリガーゼで連結する方法や適当なリンカーを挟んで両DNAをリガーゼで連結する方法などによって作製される。

本発明の融合タンパク質のアミノ酸配列の具体的な例としては、配列番号2および4記載のものが例示される。マイコプラズマ・ガリセプティカム由来の40キロダルトンの抗原タンパク質の配列は、配列番号2中、第64～456番目、配列番号4中、第693～1086番目であり、配列番号2中、第1～63番目は、MDV由来の外膜タンパク質gBのシグナル配列であり、配列番号4中、第1～672番目は、MDV由来の外膜タンパク質gBのほぼ全長である。これらの融合タンパク質をコードするハイブリッドDNAの塩基配列の具体例としては、配列番号1および3記載のものが例示される。

もちろん、本発明において融合タンパク質及びハイブリッドDNAはこれに限定されるものではない。

(組み換えアビポックスウイルス)

本発明の組み換えアビポックスウイルスは、アビポックスウイルスの非必須領

域に上述のハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビボックスウイルスである。本発明の組み換えアビボックスウイルスの構築方法は常法に従えば良く、例えば特開平1-168,279号公報に記載の方法に従えばよい。すなわち、まずアビボックスウイルスの非必須領域に組み込んだ第一の組み換えベクターが構築
5 される。

本発明で用いるアビボックスウイルスの非必須領域は、グエイルボックスウイルスのTK領域、七面鳥ボックスウイルスのTK遺伝子領域や特開平1-168,279号公報に記載されたDNA断片が挙げられ、好ましくは、前記公報記載の約7.3KbのEcoRI断片、約5.2KbのHindIII断片、約5.0
10 KbのEcoRI-HindIII断片、約4.0KbのBamHI断片と相同組み換えをおこす領域である。

本発明で用いるベクターとしては、例えばpBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC7、pUC8、pUC9、pUC18、pUC
15 19などのプラスミド、λファージ、M13ファージなどのファージ、pHC7
9などのコスミドなどが挙げられる。

本発明で用いられるアビボックスウイルスは鳥類に感染するウイルスであれば特に限定されない。このようなウイルスの具体例としては、ピジョンボックスウイルス、フォウルボックスウイルス（以下、FPVという）、カナリーボックス
20 ックスウイルス、FPV、七面鳥ボックスウイルス、より好ましくは、ピジョン
ボックスウイルス、FPVである。とりわけ好ましいアビボックスウイルスの具
体例としては、ATCC VR-251、ATCC VR-249、ATCC
VR-250、ATCC VR-229、ATCC VR-229、ATCC
VR-288、西ヶ原株、泗水株、CEVA株、CEVA株由来のウイルスのう
25 ち鶏胚線維芽細胞に感染したときに大きいプラークを形成するウイルス株などの
ときFPVや、NP株（鶏胎化鳩痘毒中野株）などのように鶏痘生ワクチン株
として使用されるFPVと近縁のウイルスなどが例示される。これらの株はいず
れも市販されているなど、容易に入手することができる。

ついで、前記第一の組み換えベクターの非必須領域内に本発明のハイブリッド

DNAを組み込んだ第二の組み換えベクターを構築する。通常、ハイブリッドDNAは、合成天然を問わず、アビボックスウイルスが保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能するものであればいかなる塩基配列のものでもよく、チミジンキナーゼをコードするアビボックスウイルス由来遺伝子のプロモーターなどのアビボックスウイルス固有のプロモーターはもちろんのこと、アビボックスウイルス以外のウイルス由来のDNAや真核生物、原核生物どちら由来のDNAであっても、上記条件を満たす限りにおいては当然本発明に使用可能である。このようなプロモーターの具体例としては、例えば *Journal of Virology*、51、662-669頁(1984年)に例示されるような VVのプロモーター、具体的には7.5KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーター、19KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーター、42KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーター、チミジンキナーゼをコードするVV遺伝子のプロモーター、28KポリペプチドをコードするVV遺伝子のプロモーターなどが例示される。また、Mossらの文献 *J. Mol. Biol.*、210、49-76頁、771-784頁(1989年)を参考にした合成プロモーター、Davidsonの合成プロモーターや、その一部をプロモーター活性が喪失しない範囲での削除、変更などにより改変されたもの(例えば、TTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAATAATAAATACAATAATTAAATTACGCGTAAAAATTGAAAAACTATTCTAATTTATTGCACTC、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTGGCATATAAATAATAAATACAATAATTAAATTACGCGTAAAAATTGAAAAACTATTCTAATTTATTGCACTCなど)を用いることもできる。

また、組み換えウイルスの検出が容易であるという点から、 β -ガラクトシダーゼをコードするDNAなどマーカー遺伝子も組み込むことができる。

組み換えアビボックスウイルスの作製は、予めアビボックスウイルスを感染させた動物培養細胞に上記の第二の組み換えベクターを移入し、ベクターDNAとウイルスゲノムDNAとの間で相同組み換えを起こさせればよい。ここで用いられる動物培養細胞は、アビボックスウイルスが増殖可能なものであればよく、そ

の具体例としてはC E F細胞や発育鶏卵しょう尿膜細胞などが例示される。

宿主細胞に感染しているウイルスからブランクハイブリダイゼーションなどの方法により目的とする組み換えアビボックスウイルスを単離する事ができる。

(生ワクチン)

- 5 上記の方法によって構築された本発明の組み換えウイルスは抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンとして鳥類に接種することができる。

本発明の生ワクチンの調製方法は特に限定されないが、例えば、次の方法によって調製される。本発明の組み換えウイルスを該ウイルスが生育することができる細胞（以下、宿主細胞という）に感染させ、増殖させたのち、細胞を回収し、

- 10 破碎する。この細胞破碎物を遠心分離によって沈殿物と組み換えウイルスを含む高力価上清とに分離する。得られた上清は実質的に宿主細胞を含まず、細胞培養培地と組み換えウイルスを含んでおり、生ワクチンとして使用することができる。この上清には薬理学的に問題のないキャリアー、例えば生理食塩水などを添加し、希釈することもできる。また、この上清は凍結乾燥しても生ワクチンと

- 15 して使用できる。本発明の生ワクチンの家禽への投与法は特に限定されず、例えば皮膚に引っかき傷を付けて生ワクチンを接種する方法、注射により接種する方法、飼料や水に混合し経口投与する方法、エアロゾルやスプレーなどにより吸入させる方法などが挙げられる。生ワクチンとして使用するには、通常の生ワクチンの使用方法と同等でよく、例えばニワトリ一羽あたり 10^2 から 10^8 プラーク

- 20 フォーミングユニット（以下、PFUという）程度を接種する。注射による場合、通常0.1 ml程度の生理食塩水などの等張溶媒に本発明の組み換えウイルスを懸濁して用いることができる。本発明の生ワクチンは、ふつうの条件下では凍結乾燥すればよく、室温での保存が可能である。また、ウイルスの懸濁液を -20 から -70°C 下で凍結させ保存する事も可能である。

- 25 特に、前記ヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドをコードする遺伝子が、ヘルペスウイルスのエピトープが1以上、好ましくは天然の外膜タンパク質との相同性が90%以上のポリペプチドをコードするものである場合、本発明の生ワクチンは、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症とアビボックスウイルス感染症に対するワクチンとして機能するほか、外膜タンパク質の由来

となるヘルペスウイルスの感染症に対しても有効なワクチンとして機能する、いわゆる三価のワクチンとして用いることができる。

実施例

実施例1 マレック病ウイルスのgB遺伝子のシグナル直後へTTM-1タンパ

- 5 ク質DNAが連結したハイブリッドDNAを有する組み換えpNZ40K-Sの構築 (図1、2、3参照)

まず、特開平6-78764号公報に開示されている、マレック病ウイルスのgB遺伝子を含むプラスミドpUCgBを制限酵素BamHIとSalIで切断し、3.9kbの断片を回収した。

- 10 これとは別に、pUC18のHindIII-SalI部位にプラスミドpNZ1729R (Yanagidaら、J. Virol.、66、1402-1408 (1992))をHindIIIとSalIとで消化して得られた約140dpのDNA断片を挿入し、さらにHindIII-PstI部位に合成DNA (5'-AGCTGCCCCCCCCGGCAAGCTTGCA-3')を挿入し、
15 次にSalI-EcoRI部位に合成DNA (5'-TCGACATTTTATGTGTAC-3')を挿入し、最後にSacI-EcoRI部位に合成DNA (5'-AATCGGCCGGGGGGGCCAGCT-3')を挿入して、プラスミドpGTPsを構築した。

- 得られたpGTPsを制限酵素SalIとBamHIで開裂させ、リガーゼで
20 前出の3.9kbの断片と連結し、pGTPsMDgBを取得した。次に、WO94/23019号公報に開示のpNZ2929XM1をEcoRIで切断し、740bpの断片を回収したのちT4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化した。pGTPsMDgBもXbaIで開裂させた後、T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、末端平滑化した740bp断片とリガーゼによって連結し、
25 て、新たなプラスミドを構築した。この新たなプラスミドをBglIIとSalIで切断して3.0kbの断片を回収し、pNZ2927XM1のBglIIとSalIで切断した1.1kbの断片とリガーゼによって連結し、マレック病ウイルスのgB遺伝子のシグナル配列部分のC末端にTTM-1遺伝子のN末端が連結したプラスミドが得られた。

最後に、pGTPs40K-SをSalIとBamHIで切断した1.4kbを、SalIとBamHIで開裂させたプラスミドpNZ1829R断片(9.3kb)とリガーゼによって連結し、目的の組み換え用プラスミドpNZ40K-S(10.7kb)を取得した。

5 実施例2 マレック病ウイルスのgB遺伝子のC末端にTTM-1タンパク質DNAが連結したハイブリッドDNAを有する組み換え用プラスミドpNZ40K-Cの構築 (図4、5、6参照)

実施例1のプラスミドpGTPsMDgBを制限酵素MluIで切断後、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化した。そのあとに制限酵素XbaIで切断して、1.9kbの断片を回収した。また、ファージミッドベクターp BluescriptII (東洋紡績株式会社製; 以下、pBSKSI Iという)を制限酵素XbaIとSmaIで開裂後、先ほどの1.9kbの断片とリガーゼによって連結したプラスミドを取得した。つぎにこのプラスミドを制限酵素EcoRIとSalIで開裂後、pNZ2929XM1を制限酵素EcoRIとSalIで切断した550bp断片および、EcoT22IとSalIで切断した615bpとリガーゼによって連結したプラスミドを取得した。このプラスミドを制限酵素XbaIとSalIで切断した2.7kbの断片と、pGTPsMDgBを制限酵素XbaIとSalIで切断した3.3kbの断片とをリガーゼによって連結し、マレック病ウイルスのgB遺伝子のC末端にTTM-1遺伝子のN末端が連結したプラスミドpGTPs40K-Cが得られた。

最後に、pGTPs40K-CをSalIとXbaIで切断した2.7kbを、SalIとXbaIで開裂させたプラスミドpNZ1829R断片(9.5kb)とリガーゼによって連結し、目的の組み換え用プラスミドpNZ40K-C(12.2kb)を取得した。

25 実施例3 組み換えFPV 40K-C、40K-Sの作製と純化

単層のCEFに鶏痘生ワクチン株であるNP株をm. o. i. =0.1で感染させて、3時間後にこれらの細胞をトリプシン処理で剥がし、細胞懸濁液とした。この懸濁液中の 2×10^7 個の細胞と10 μ gの組み換え用プラスミドpNZ40K-CまたはpNZ40K-Sと混合し、Saline G(0.14M塩化

ナトリウム、0.5 mM塩化カリウム、1.1 mMリン酸一水素二ナトリウム、
1.5 mMリン酸二水素一カリウム、0.5 mM塩化マグネシウム・6水和物、
0.011%グルコース)に懸濁し、室温においてジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いて3.0 KV cm⁻¹、0.4 msec、25℃の条件下でエレクトロポレーションした。プラスミドを導入した細胞を、その後37℃、72時間培養し、3回の凍結融解によって細胞を溶解し、組み換えウイルスを含むウイルスを回収した。

回収した組み換えウイルスは、次のようにして選択した。回収したウイルス液を単層のCEFに感染させ、生育培地を含んだ10 mlの寒天溶液を重層した。

10 室温中で寒天を温めたのち、FPVのプラークが出現するまで37℃で培養後ブルオギャル(Blue-gal)を200 µg/mlの濃度で含んだ寒天溶液を重層し、さらに48時間37℃で培養した。全プラークのうち約1%のプラークが青く発色した。これらの青いプラークを単離回収して、さらに同様の操作を繰り返して全てのプラークが青く染まるまでウイルスの純化を行った。通常この繰り返しは3~4日で終了する。この純化されたウイルスをそれぞれ40 K-C、40 K-Sと名付けた。40 K-C、40 K-Sはドットプロットハイブリダイゼーション、サザンプロットハイブリダイゼーションによって組み込んだ各DNAの位置を確認した。

実施例4 40 K-C、40 K-S感染細胞におけるTTM-1ポリペプチドの

20 発現

40 K-C及び40 K-SがTTM-1ポリペプチドを感染細胞中で発現することを調べるために、抗マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株血清を用いたウェスタンブロッティング法を行った。40 K-Cまたは40 K-SをCEFに感染させ、37℃でプラークが出現するまで培養後、セルスクレーパーによって細胞をはがし取り培養上清とともに8000 G、20分間遠心し、細胞を含む沈さ(以下、ペレットという)を回収した。さらに、ペレットをPBSで洗浄後、8000 G、20分間遠心し、洗浄した細胞を含むペレットを回収した。このペレットを150 µlのPBSで懸濁し、そのうちの50 µlに等量のレムリバッファー(10%メルカプトエタノールを含む)を加え、3分間煮沸処理したのち、

Laemmliの方法(Nature、227、668-685(1970))に従い、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、SDS-PAGEという)に付した。SDS-PAGEを終了したゲルで分離したポリペプチドをBurnett等(A. Anal. Biochem.、112、
5 195-203(1970))やTowbin等の方法(Proc. Natl. Acad. Sci.、75、4350-4354(1979))に従ってポリビニリデンジフルオロライド膜(immobilon Transfer Membrane(ミリポア社);以下、メンブレンという)に電気泳動によって移行させた。メンブレンは、3%のスキムミルクを含むPBSに1時間浸せき
10 して、非特異結合が起きないようにブロッキングし、次に鶏抗マイコプラズマ・ガリセプチカムS6株血清を1000倍に希釈したPBSに1時間浸せきした。

次に、PBSでメンブレンをすすいだ後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼコンジュゲート抗鶏IgGを含むPBSに1時間浸せきした。PBSでメンブレンをすすいだ後、発色基質としてニトロブルーテトラゾリウム塩(NBT)
15 (GIBCO-BRL社製)と、5-ブromo-4-クロロ-3-インドールフォスフェイト-P-トリルイジン塩(BCIP)(GIBCO-BRL社製)を用い、反応液(100mMトリス塩酸(pH7.5)、0.15M塩化ナトリウム、50mM塩化マグネシウム)10m中で発色反応を行った。

ウエスタンブロットの結果を図7に示す。

20 図7に示すとおり、40K-S、40K-C感染細胞ともに、目的の位置に反応するタンパク質が確認でき、組み換えFPV感染細胞で予想通りのタンパク質を発現していることを確認できた。

実施例5 組み換えFPV接種鶏の抗体誘導能

40K-C及び40K-SをCEFで37℃、48時間培養後、二回凍結融解
25 を繰り返し、細胞浮遊液を回収し、ウイルスタイターが、 10^6 pfu/mlとなるように調製したのち、生後7日のSPF鶏(Line M、日本生物科学研究所)の右翼膜に穿刺用針で10 μ l接種した。接種後善感発痘を観察し、接種から二週後に血清を採取した。採取した血清の抗体価はELISA法で測定した。精製したTTM-1ポリペプチドを1 μ g/wellとなるようにバイカーボネ

イトバッファーに溶解し、96wellマイクロタイタープレートに吸着させた後、スキムミルクでブロッキングを行ってその後の非特異的吸着を防いだ。次に各ウェルに被検血清の希釈液をのせた後ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ結合抗鶏イムノグロブリン抗体（ウサギ抗体）としてのせた。十分洗浄した後、基質として2, 2'-アジノジエチル-ベンズチアゾリンスルフォネートを加え、イムノリーダーで405nmの波長光に対する吸光度で抗体の相対希釈倍率を測定した。なお、対照一次抗体には、抗TTM-1ポリペプチド鶏血清を用いた。

表1 rFPV接種鶏血清のELISA抗体価

鶏の処理方法	抗TTM-1抗体価
40K-S接種	1,024
40K-C接種	512
TTM-1免疫	512
非接種	1

抗体価は非接種鶏群の抗体価を1とした場合の血清の希釈倍率

表1に示すとおり、40K-Cまたは40K-Sを接種した鶏の血清中の抗TTM-1抗体価は、TTM-1ポリペプチドを免疫した鶏血清抗体価と同等以上に上昇した。このことから、組み換えFPVは接種鶏に有意に抗体価を誘導することが確かめられた。

実施例6 組み換えFPV接種鶏へのマイコプラズマ攻撃試験

攻撃試験は基本的に動物用生物学的製剤基準に従った。以下、簡単にその方法を記述する。

試験用SPF鶏（Line M、日本生物科学研究所）が5週齢のときに40K-C及び40K-Sを右翼膜に穿刺用針で10 μ l接種した。接種後善感発症を観察し、免疫が成立したことを確認した。接種後2週目にマイコプラズマガリセプティカムR株を10⁴～10⁵cfu/羽となるように気管内に強制投与し、感染を成立させた。感染14日後にネブタールで屠殺剖検し、気管の病理組織

標本を作製し、気管粘膜の厚さと、組織所見をもとに気管病変スコアを測定した。スコアの基準も製剤基準に則り、群内の各鶏の気管病変スコアの平均を各群のスコアとした。参考までに、気管病変スコアの判定基準を表2に記す。

5 表2 気管病変スコアの判定基準

10	粘膜の厚さ	組織所見	スコア
	90 μ m以上	正常なもの	0
	90 μ m以上	粘膜固有層に円形細胞の軽度な浸潤あるいは微少集簇巣を認めるが、上皮細胞は正常なもの	1
	110 μ m未満	上皮細胞は変性あるいは脱落し、粘膜固有層は円形細胞の浸潤により中程度に肥厚しているもの	2
	110 μ m以上	上皮細胞は変性あるいは脱落し、粘膜固有層は毛細血管の増生及び円形細胞の浸潤により高度に肥厚し、腔内には細胞崩壊産物の堆積が認められるもの	3

15

判定結果を表3および図8に示した。

表3 rFPV接種鶏気管病変平均スコア

20	鶏の処理方法	病変スコア	
		平均	標準誤差
	40K-S接種	1.38	0.16
	40K-C接種	1.89	0.13
	市販ワクチン免疫	2.11	0.24
25	TTM-1ポリペプチド免疫	1.09	0.23
	非接種	2.27	0.21

この結果から明らかなように、40K-C及び40K-Sを接種した鶏の病変スコアは非接種鶏に比べて明らかに低く、マイコプラズマチャレンジに対して明

らかな感染防御能を鶏に付与していることがわかった。このことから、40K-Cおよび40K-Sはマイコプラズマガリセプティカムに対する有効なワクチンとなりうることがわかった。

産業上の利用可能性

- 5 本発明によれば、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質由来のポリペプチドとヘルペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドとの融合タンパク質が得られ、この融合タンパク質は抗マイコプラズマ感染症、抗鶏痘、抗マレック病ワクチンとして有用である。また、当該融合タンパク質をコードするハイブリッドDNAを利用することにより、マイコプラズマ・ガリセプティカ
- 10 ム抗原タンパク質を宿主細胞表面に効率よく提示するばかりでなく、細胞外に分泌して宿主の抗原認識担当細胞に効果的に認識されるアビボックスウイルスが得られ、該組み換えアビボックスウイルスは強力な抗マイコプラズマ感染症ワクチンとして有用である。

15 配列表

配列番号： 1

配列の長さ : 1 3 7 1

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

- ## 20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 ハイブリッドDNA (40K-S)

配列

ATG CAC TAT TTT AGG CGG AAT TGC ATA TTT TTC CTT ATA GTT ATT CTA 48

25 Met His Tyr Phe Arg Arg Asn Cys Ile Phe Phe Leu Ile Val Ile Leu

1 5 10 15

TAT GGT ACG AAC TCA TCT CCG AGT ACC CAA AAT GTG ACA TCA AGA GAA 96

Tyr Gly Thr Asn Ser Ser Pro Ser Thr Gln Asn Val Thr Ser Arg Glu

20

25

30

GTT GTT TCG AGC GTC CAG TTG TCT GAG GAA GAG TCT ACG TTT TAT CTT 144
 Val Val Ser Ser Val Gln Leu Ser Glu Glu Glu Ser Thr Phe Tyr Leu
 35 40 45
 TGT CCC CCA CCA GTG GGT TCA ACC GTG ATC CGT CTA GAA TTC GGC TGT 192
 5 Cys Pro Pro Pro Val Gly Ser Thr Val Ile Arg Leu Glu Phe Gly Cys
 50 55 60
 ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAT GCA AAC CCA AAT AAT GGC CAA ACC CAA 240
 Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr Gln
 65 70 75 80
 10 TTA GAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACA GAT CTA ATC AAT GCT AAA GCG 288
 Leu Glu Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys Ala
 85 90 95
 ATG ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCC AAG ATT GAA GCT ACT TTA 336
 Met Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser Leu
 15 100 105 110
 TCA TCT GCT TAT AGT GAA GCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT GCA 384
 Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val Asn Asn Asn Leu Asn Ala
 115 120 125
 ACA TTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC ATC 432
 20 Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala Ile 440
 130 135 140
 AAC CAA GCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAC CCA AAT 480
 Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro Asn
 145 150 155 160
 25 TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT GCT 528
 Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg Ala
 165 170 175

	ACT AAC CTT GAA GGT TTG TCA TCA ACT GCT TAT AAT CAA ATT CGC AAT	576
	Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg Asn	
	180 185 190	
	AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAA GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA ACA	624
5	Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys Thr	
	195 200 205	
	CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ACG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT ACT	672
	Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile Thr	
	210 215 220	
10	ACA GCT AAT AAG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA CAA	720
	Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu Gln	
	225 230 235 240	
	AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG ATT	768
	Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val Ile	
15	245 250 255	
	CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT GTT	816
	Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn Val	
	260 265 270	
	CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA CCC	864
20	Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr Pro	
	275 280 285	
	GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT TGG AAT GGT GAT GAA CCT	912
	Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Trp Asn Gly Asp Glu Pro	
	290 295 300	
25	TCA AGT AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT ATC ACA GAT GTT TCT TGG	960
	Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser Trp	
	305 310 315 320	

ATT TAT AGT TTA GCT GGA ACA AAC ACG AAG TAC CAA TTT AGT TTT AGC 1008
 Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe Ser
 325 330 335
 AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG GTT 1056
 5 Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu Val
 340 345 350
 AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA CAA TAC AAA TTA AAT AAT 1104
 Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn Asn
 355 360 365
 10 GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT TCA ACT AGT GCA AAT AAT 1152
 Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn Asn
 370 375 380
 ACT ACA GCT AAT CCA ACT CCA GCA GTT GAT GAG ATT AAA GTT GCT AAA 1200
 Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp Glu Ile Lys Val Ala Lys
 15 385 390 395 400
 ATC GTT TTA TCA GGT TTA AGA TTT GGC CAA AAC ACA ATC GAA TTA AGT 1248
 Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln Asn Thr Ile Glu Leu Ser
 405 410 415
 GTT CCA ACG GGT GAA GGA AAT ATG AAT AAA GTT GCG CCA ATG ATT GGC 1296
 20 Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys Val Ala Pro Met Ile Gly
 420 425 430
 AAC ATT TAT CTT AGC TCA AAT GAA AAT AAT GCT GAT AAG ATC CCC GGG 1344
 Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn Ala Asp Lys Ile Pro Gly
 435 440 445
 25 TAC CGT CGA CCC GGT ACA TTT TTA TAA 1371
 Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu ***
 450 455

配列表

配列番号 : 2

配列の長さ : 4 5 6

配列の型 : アミノ酸

5 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

	Met	His	Tyr	Phe	Arg	Arg	Asn	Cys	Ile	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Leu
10	1				5					10					15	
	Tyr	Gly	Thr	Asn	Ser	Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Asn	Val	Thr	Ser	Arg	Glu
				20					25					30		
	Val	Val	Ser	Ser	Val	Gln	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Thr	Phe	Tyr	Leu
				35				40						45		
15	Cys	Pro	Pro	Pro	Val	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Arg	Leu	Glu	Phe	Gly	Cys
		50					55					60				
	Met	Ser	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Ala	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Thr	Gln
		65				70					75				80	
	Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Asn	Ala	Lys	Ala
20					85					90					95	
	Met	Thr	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Ala	Lys	Ile	Glu	Ala	Ser	Leu
				100						105					110	
	Ser	Ser	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ala	Glu	Thr	Val	Asn	Asn	Asn	Leu	Asn	Ala
				115						120					125	
25	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Lys	Met	Ala	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile
		130					135						140			
	Asn	Gln	Ala	Asn	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp	Asn	Glu	His	Pro	Asn
	145					150					155				160	

Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg Ala
 165 170 175
 Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg Asn
 180 185 190
 5 Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys Thr
 195 200 205
 Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile Thr
 210 215 220
 Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu Gln
 10 225 230 235 240
 Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val Ile
 245 250 255
 Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn Val
 260 265 270
 15 Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr Pro
 275 280 285
 Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Trp Asn Gly Asp Glu Pro
 290 295 300
 Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser Trp
 20 305 310 315 320
 Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe Ser
 325 330 335
 Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu Val
 340 345 350
 25 Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn Asn
 355 360 365
 Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn Asn
 370 375 380

Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp Glu Ile Lys Val Ala Lys
385 390 395 400
Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln Asn Thr Ile Glu Leu Ser
405 410 415
5 Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys Val Ala Pro Met Ile Gly
420 425 430
Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn Ala Asp Lys Ile Pro Gly
435 440 445
Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu ***
10 450 455

配列表

配列番号：3

配列の長さ : 3 2 6 1

15 配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 ハイブリッドDNA (40K-C)

20 配列

	ATG CAC TAT TTT AGG CGG AAT TGC ATA TTT TTC CTT ATA GTT ATT CTA	48
	Met His Tyr Phe Arg Arg Asn Cys Ile Phe Phe Leu Ile Val Ile Leu	
	1 5 10 15	
	TAT GGT ACG AAC TCA TCT CCG AGT ACC CAA AAT GTG ACA TCA AGA GAA	96
25	Tyr Gly Thr Asn Ser Ser Pro Ser Thr Gln Asn Val Thr Ser Arg Glu	
	20 25 30	
	GTT GTT TCG AGC GTC CAG TTG TCT GAG GAA GAG TCT ACG TTT TAT CTT	144
	Val Val Ser Ser Val Gln Leu Ser Glu Glu Glu Ser Thr Phe Tyr Leu	
	35 40 45	

TGT CCC CCA CCA GTG GGT TCA ACC GTG ATC CGT CTA GAA CCG CCG CGA 192
 Cys Pro Pro Pro Val Gly Ser Thr Val Ile Arg Leu Glu Pro Pro Arg
 50 55 60
 AAA TGT CCC GAA CCT AGA AAA GCC ACC GAG TGG GGT GAA GGA ATC GCG 240
 5 Lys Cys Pro Glu Pro Arg Lys Ala Thr Glu Trp Gly Glu Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 ATA TTA TTT AAA GAG AAT ATC AGT CCA TAT AAA TTT AAA GTG ACG CTT 288
 Ile Leu Phe Lys Glu Asn Ile Ser Pro Tyr Lys Phe Lys Val Thr Leu
 85 90 95
 10 TAT TAT AAA AAT ATC ATT CAG ACG ACG ACA TGG ACG GCG ACG ACA TAT 336
 Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Gln Thr Thr Thr Trp Thr Gly Thr Thr Tyr
 100 105 110
 AGA CAG ATC ACT AAT CGA TAT ACA GAT AGG ACG CCC GTT TCC ATT GAA 384
 Arg Gln Ile Thr Asn Arg Tyr Thr Asp Arg Thr Pro Val Ser Ile Glu
 15 115 120 125
 GAG ATC ACG GAT CTA ATC GAC GGC AAA GGA AGA TGC TCA TCT AAA GCA 432
 Glu Ile Thr Asp Leu Ile Asp Gly Lys Gly Arg Cys Ser Ser Lys Ala
 130 135 140
 AGA TAC CTT AGA AAC AAT GTA TAT GTT GAA GCG TTT GAC AGG GAT GCG 480
 20 Arg Tyr Leu Arg Asn Asn Val Tyr Val Glu Ala Phe Asp Arg Asp Ala
 145 150 155 160
 GGA GAA AAA CAA GTA CTT CTA AAA CCA TCA AAA TTC AAC ACG CCC GAA 528
 Gly Glu Lys Gln Val Leu Leu Lys Pro Ser Lys Phe Asn Thr Pro Glu
 165 170 175
 25 TCT AGG GCA TGG CAC ACG ACT AAT GAG ACG TAT ACC GTG TGG GGA TCA 576
 Ser Arg Ala Trp His Thr Thr Asn Glu Thr Tyr Thr Val Trp Gly Ser
 180 185 190

	CCA TGG ATA TAT CGA ACG GGA ACC TCC GTC AAT TGT ATA GTA GAG GAA	624
	Pro Trp Ile Tyr Arg Thr Gly Thr Ser Val Asn Cys Ile Val Glu Glu	
	195 200 205	
	ATG GAT GCC CGC TCT GTG TTT CCG TAT TCA TAT TTT GCA ATG GCC AAT	672
5	Met Asp Ala Arg Ser Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Phe Ala Met Ala Asn	
	210 215 220	
	GGC GAC ATC GCG AAC ATA TCT CCA TTT TAT GGT CTA TCC CCA CCA GAG	720
	Gly Asp Ile Ala Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Gly Leu Ser Pro Pro Glu	
	225 230 235 240	
10	GCT GCC GCA GAA CCC ATG GGA TAT CCC CAG GAT AAT TTC AAA CAA CTA	768
	Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Tyr Pro Gln Asp Asn Phe Lys Gln Leu	
	245 250 255	
	GAT AGC TAT TTT TCA ATG GAT TTG GAC AAG CGT CGA AAA GCA AGC CTT	816
	Asp Ser Tyr Phe Ser Met Asp Leu Asp Lys Arg Arg Lys Ala Ser Leu	
15	260 265 270	
	CCA GTC AAG CGT AAC TTT CTC ATC ACA TCA CAC TTC ACA GTT GGG TGG	864
	Pro Val Lys Arg Asn Phe Leu Ile Thr Ser His Phe Thr Val Gly Trp	
	275 280 285	
	GAC TGG GCT CCA AAA ACT ACT CGT GTA TGT TCA ATG ACT AAG TGG AAA	912
20	Asp Trp Ala Pro Lys Thr Thr Arg Val Cys Ser Met Thr Lys Trp Lys	
	290 295 300	
	GAG GTG ACT GAA ATG TTG CGT GCA ACA GTT AAT GGG AGA TAC AGA TTT	960
	Glu Val Thr Glu Met Leu Arg Ala Thr Val Asn Gly Arg Tyr Arg Phe	
	305 310 315 320	
25	ATG GCC CGT GAA CTT TCG GCA ACG TTT ATC AGT AAT ACG ACT GAG TTT	1008
	Met Ala Arg Glu Leu Ser Ala Thr Phe Ile Ser Asn Thr Thr Glu Phe	
	325 330 335	

GAT CCA AAT CGC ATC ATA TTA GGA CAA TGT ATT AAA CGC GAG GCA GAA 1056
 Asp Pro Asn Arg Ile Ile Leu Gly Gln Cys Ile Lys Arg Glu Ala Glu
 340 345 350
 GCA GCA ATC GAG CAG ATA TTT AGG ACA AAA TAT AAT GAC AGT CAC GTC 1104
 5 Ala Ala Ile Glu Gln Ile Phe Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Ser His Val
 355 360 365
 AAG GTT GGA CAT GTA CAA TAT TTC TTG GCT CTC GGG GGA TTT ATT GTA 1152
 Lys Val Gly His Val Gln Tyr Phe Leu Ala Leu Gly Gly Phe Ile Val
 370 375 380
 10 GCA TAT CAG CCT GTT CTA TCC AAA TCC CTG GCT CAT ATG TAC CTC AGA 1200
 Ala Tyr Gln Pro Val Leu Ser Lys Ser Leu Ala His Met Tyr Leu Arg
 385 390 395 400
 GAA TTG ATG AGA GAC AAC AGG ACC GAT GAG ATG CTC GAC CTG GTA AAC 1248
 Glu Leu Met Arg Asp Asn Arg Thr Asp Glu Met Leu Asp Leu Val Asn
 15 405 410 415
 AAT AAG CAT GCA ATT TAT AAG AAA AAT GCT ACC TCA TTG TCA CGA TTG 1296
 Asn Lys His Ala Ile Tyr Lys Lys Asn Ala Thr Ser Leu Ser Arg Leu
 420 425 430
 CGG CGA GAT ATT CGA AAT GCA CCA AAT AGA AAA ATA ACA TTA GAC GAC 1344
 20 Arg Arg Asp Ile Arg Asn Ala Pro Asn Arg Lys Ile Thr Leu Asp Asp
 435 440 445
 ACC ACA GCT ATT AAA TCG ACA TCG TCT GTT CAA TTC GCC ATG CTC CAA 1392
 Thr Thr Ala Ile Lys Ser Thr Ser Ser Val Gln Phe Ala Met Leu Gln
 450 455 460
 25 TTT CTT TAT GAT CAT ATA CAA ACC CAT ATT AAT GAT ATG TTT AGT AGG 1440
 Phe Leu Tyr Asp His Ile Gln Thr His Ile Asn Asp Met Phe Ser Arg
 465 470 475 480

	ATT GCC ACA GCT TGG TGC GAA TTG CAG AAT AGA GAA CTT GTT TTA TGG	1488
	Ile Ala Thr Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn Arg Glu Leu Val Leu Trp	
	485 490 495	
	CAC GAA GGG ATA AAG ATT AAT CCT AGC GCT ACA GCG AGT GCA ACA TTA	1536
5	His Glu Gly Ile Lys Ile Asn Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ala Thr Leu	
	500 505 510	
	GGA AGG AGA GTG GCT GCA AAG ATG TTG GGG GAT GTC GCT GCT GTA TCG	1584
	Gly Arg Arg Val Ala Ala Lys Met Leu Gly Asp Val Ala Ala Val Ser	
	515 520 525	
10	AGC TGC ACT GCT ATA GAT GCG GAA TCC GTC ACT TTG CAA AAT TCT ATG	1632
	Ser Cys Thr Ala Ile Asp Ala Glu Ser Val Thr Leu Gln Asn Ser Met	
	530 535 540	
	CGA GTT ATC ACA TCC ACT AAT ACA TGT TAT AGC CGA CCA TTG GTT CTA	1680
	Arg Val Ile Thr Ser Thr Asn Thr Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Leu	
15	545 550 555 560	
	TTT TCA TAT GGA GAA AAC CAA GGA AAC ATA CAG GGA CAA CTC GGT GAA	1728
	Phe Ser Tyr Gly Glu Asn Gln Gly Asn Ile Gln Gly Gln Leu Gly Glu	
	565 570 575	
	AAC AAC GAG TTG CTT CCA ACG CTA GAG GCT GTA GAG CCA TGC TCG GCT	1776
20	Asn Asn Glu Leu Leu Pro Thr Leu Glu Ala Val Glu Pro Cys Ser Ala	
	580 585 590	
	AAT CAT CGT AGA TAT TTT CTG TTT GGA TCC GGT TAT GCT TTA TTT GAA	1824
	Asn His Arg Arg Tyr Phe Leu Phe Gly Ser Gly Tyr Ala Leu Phe Glu	
	595 600 605	
25	AAC TAT AAT TTT GTT AAG ATG GTA GAC GCT GCC GAT ATA CAG ATT GCT	1872
	Asn Tyr Asn Phe Val Lys Met Val Asp Ala Ala Asp Ile Gln Ile Ala	
	610 615 620	

AGC ACA TTT GTC GAG CTT AAT CTA ACC CTG CTA GAA GAT CGG GAA ATT 1920
 Ser Thr Phe Val Glu Leu Asn Leu Thr Leu Leu Glu Asp Arg Glu Ile
 625 630 635 640
 TTG CCT TTA TCC GTT TAC ACA AAA GAA GAG TTG CGT GAT GTT GGT GTA 1968
 5 Leu Pro Leu Ser Val Tyr Thr Lys Glu Glu Leu Arg Asp Val Gly Val
 645 650 655
 TTG GAT TAT GCA GAA GTA GCT CGC CGC AAT CAA CTA CAT GAA CTT AAA 2016
 Leu Asp Tyr Ala Glu Val Ala Arg Arg Asn Gln Leu His Glu Leu Lys
 660 665 670
 10 TTT TAT GAC ATA AAC AAA GTA ATA GAA GTG GAT ACA AAT TAC GCG GGG 2064
 Phe Tyr Asp Ile Asn Lys Val Ile Glu Val Asp Thr Asn Tyr Ala Gly
 675 680 685
 CTG CAG GAA TTC GGC TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAT GCA AAC CCA 2112
 Leu Gln Glu Phe Gly Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro
 15 690 695 700
 AAT AAT GGC CAA ACC CAA TTA GAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACA GAT 2160
 Asn Asn Gly Gln Thr Gln Leu Glu Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp
 705 710 715 720
 CTA ATC AAT GCT AAA GCG ATG ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCC 2208
 20 Leu Ile Asn Ala Lys Ala Met Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala
 725 730 735
 AAG ATT GAA GCT AGT TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA GCT GAA ACA GTT 2256
 Lys Ile Glu Ala Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val
 740 745 750
 25 AAC AAT AAC CTT AAT GCA ACA TTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT 2304
 Asn Asn Asn Leu Asn Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr
 755 760 765

	AAT TTA GAA TCA GCC ATC AAC CAA GCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT	2352
	Asn Leu Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe	
	770 775 780	
	GAT AAT GAA CAC CCA AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC	2400
5	Asp Asn Glu His Pro Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr	
	785 790 795 800	
	ACT TTA GAA CAA CGT GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTG TCA TCA ACT GCT	2448
	Thr Leu Glu Gln Arg Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala	
	805 810 815	
10	TAT AAT CAA ATT CGC AAT AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAA GCT AGT	2496
	Tyr Asn Gln Ile Arg Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser	
	820 825 830	
	AGT TTA ATA ACT AAA ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ACG CTT TTA	2544
	Ser Leu Ile Thr Lys Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu	
15	835 840 845	
	GAT TCT AAT GAG ATT ACT ACA GCT AAT AAG AAT ATT AAT AAT ACG TTA	2592
	Asp Ser Asn Glu Ile Thr Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu	
	850 855 860	
	TCA ACT ATT AAT GAA CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT	2640
20	Ser Thr Ile Asn Glu Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser	
	865 870 875 880	
	TTT ATT AAA AAA GTG ATT CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT	2688
	Phe Ile Lys Lys Val Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr	
	885 890 895	
25	TTT ACA AAC GCT AAT GTT CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT	2736
	Phe Thr Asn Ala Asn Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe	
	900 905 910	

AGT GCT GAT GTA ACA CCC GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT 2784
 Ser Ala Asp Val Thr Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val
 915 920 925
 TGG AAT GGT GAT GAA CCT TCA AGT AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT 2832
 5 Trp Asn Gly Asp Glu Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser
 930 935 940
 ATC ACA GAT GTT TCT TGG ATT TAT AGT TTA GCT GGA ACA AAC ACG AAG 2880
 Ile Thr Asp Val Ser Trp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys
 945 950 955 960
 10 TAC CAA TTT AGT TTT AGC AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT 2928
 Tyr Gln Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr
 965 970 975
 TTC CCT TAT AAG TTG GTT AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA 2976
 Phe Pro Tyr Lys Leu Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu
 15 980 985 990
 CAA TAC AAA TTA AAT AAT GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT 3024
 Gln Tyr Lys Leu Asn Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr
 995 1000 1005
 TCA ACT AGT GCA AAT AAT ACT ACA GCT AAT CCA ACT CCA GCA GTT GAT 3072
 20 Ser Thr Ser Ala Asn Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp
 1010 1015 1020
 GAG ATT AAA GTT GCT AAA ATC GTT TTA TCA GGT TTA AGA TTT GGC CAA 3120
 Glu Ile Lys Val Ala Lys Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln
 1025 1030 1035 1040
 25 AAC ACA ATC GAA TTA AGT GTT CCA ACG GGT GAA GGA AAT ATG AAT AAA 3168
 Asn Thr Ile Glu Leu Ser Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys
 1045 1050 1055

GTT GCG CCA ATG ATT GGC AAC ATT TAT CTT AGC TCA AAT GAA AAT AAT 3216
 Val Ala Pro Met Ile Gly Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn
 1060 1065 1070
 GCT GAT AAG ATC CCC GGG TAC CGT CGA CCC GGT ACA TTT TTA TAA 3261
 5 Ala Asp Lys Ile Pro Gly Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu ***
 1075 1080 1085

配列表

配列番号：4

10 配列の長さ：1086

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

15 配列

Met His Tyr Phe Arg Arg Asn Cys Ile Phe Phe Leu Ile Val Ile Leu
 1 5 10 15
 Tyr Gly Thr Asn Ser Ser Pro Ser Thr Gln Asn Val Thr Ser Arg Glu
 20 25 30
 20 Val Val Ser Ser Val Gln Leu Ser Glu Glu Glu Ser Thr Phe Tyr Leu
 35 40 45
 Cys Pro Pro Pro Val Gly Ser Thr Val Ile Arg Leu Glu Pro Pro Arg
 50 55 60
 Lys Cys Pro Glu Pro Arg Lys Ala Thr Glu Trp Gly Glu Gly Ile Ala
 25 65 70 75 80
 Ile Leu Phe Lys Glu Asn Ile Ser Pro Tyr Lys Phe Lys Val Thr Leu
 85 90 95
 Tyr Tyr Lys Asn Ile Ile Gln Thr Thr Thr Trp Thr Gly Thr Thr Tyr
 100 105 110

Arg Gln Ile Thr Asn Arg Tyr Thr Asp Arg Thr Pro Val Ser Ile Glu
 115 120 125
 Glu Ile Thr Asp Leu Ile Asp Gly Lys Gly Arg Cys Ser Ser Lys Ala
 130 135 140
 5 Arg Tyr Leu Arg Asn Asn Val Tyr Val Glu Ala Phe Asp Arg Asp Ala
 145 150 155 160
 Gly Glu Lys Gln Val Leu Leu Lys Pro Ser Lys Phe Asn Thr Pro Glu
 165 170 175
 Ser Arg Ala Trp His Thr Thr Asn Glu Thr Tyr Thr Val Trp Gly Ser
 10 180 185 190
 Pro Trp Ile Tyr Arg Thr Gly Thr Ser Val Asn Cys Ile Val Glu Glu
 195 200 205
 Met Asp Ala Arg Ser Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Phe Ala Met Ala Asn
 210 215 220
 15 Gly Asp Ile Ala Asn Ile Ser Pro Phe Tyr Gly Leu Ser Pro Pro Glu
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Tyr Pro Gln Asp Asn Phe Lys Gln Leu
 245 250 255
 Asp Ser Tyr Phe Ser Met Asp Leu Asp Lys Arg Arg Lys Ala Ser Leu
 20 260 265 270
 Pro Val Lys Arg Asn Phe Leu Ile Thr Ser His Phe Thr Val Gly Trp
 275 280 285
 Asp Trp Ala Pro Lys Thr Thr Arg Val Cys Ser Met Thr Lys Trp Lys
 290 295 300
 25 Glu Val Thr Glu Met Leu Arg Ala Thr Val Asn Gly Arg Tyr Arg Phe
 305 310 315 320
 Met Ala Arg Glu Leu Ser Ala Thr Phe Ile Ser Asn Thr Thr Glu Phe
 325 330 335

Asp Pro Asn Arg Ile Ile Leu Gly Gln Cys Ile Lys Arg Glu Ala Glu
 340 345 350
 Ala Ala Ile Glu Gln Ile Phe Arg Thr Lys Tyr Asn Asp Ser His Val
 355 360 365
 5 Lys Val Gly His Val Gln Tyr Phe Leu Ala Leu Gly Gly Phe Ile Val
 370 375 380
 Ala Tyr Gln Pro Val Leu Ser Lys Ser Leu Ala His Met Tyr Leu Arg
 385 390 395 400
 Glu Leu Met Arg Asp Asn Arg Thr Asp Glu Met Leu Asp Leu Val Asn
 10 405 410 415
 Asn Lys His Ala Ile Tyr Lys Lys Asn Ala Thr Ser Leu Ser Arg Leu
 420 425 430
 Arg Arg Asp Ile Arg Asn Ala Pro Asn Arg Lys Ile Thr Leu Asp Asp
 435 440 445
 15 Thr Thr Ala Ile Lys Ser Thr Ser Ser Val Gln Phe Ala Met Leu Gln
 450 455 460
 Phe Leu Tyr Asp His Ile Gln Thr His Ile Asn Asp Met Phe Ser Arg
 465 470 475 480
 Ile Ala Thr Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asn Arg Glu Leu Val Leu Trp
 20 485 490 495
 His Glu Gly Ile Lys Ile Asn Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ala Thr Leu
 500 505 510
 Gly Arg Arg Val Ala Ala Lys Met Leu Gly Asp Val Ala Ala Val Ser
 515 520 525
 25 Ser Cys Thr Ala Ile Asp Ala Glu Ser Val Thr Leu Gln Asn Ser Met
 530 535 540
 Arg Val Ile Thr Ser Thr Asn Thr Cys Tyr Ser Arg Pro Leu Val Leu
 545 550 555 560

Phe Ser Tyr Gly Glu Asn Gln Gly Asn Ile Gln Gly Gln Leu Gly Glu
 565 570 575
 Asn Asn Glu Leu Leu Pro Thr Leu Glu Ala Val Glu Pro Cys Ser Ala
 580 585 590
 5 Asn His Arg Arg Tyr Phe Leu Phe Gly Ser Gly Tyr Ala Leu Phe Glu
 595 600 605
 Asn Tyr Asn Phe Val Lys Met Val Asp Ala Ala Asp Ile Gln Ile Ala
 610 615 620
 Ser Thr Phe Val Glu Leu Asn Leu Thr Leu Leu Glu Asp Arg Glu Ile
 10 625 630 635 640
 Leu Pro Leu Ser Val Tyr Thr Lys Glu Glu Leu Arg Asp Val Gly Val
 645 650 655
 Leu Asp Tyr Ala Glu Val Ala Arg Arg Asn Gln Leu His Glu Leu Lys
 660 665 670
 15 Phe Tyr Asp Ile Asn Lys Val Ile Glu Val Asp Thr Asn Tyr Ala Gly
 675 680 685
 Leu Gln Glu Phe Gly Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro
 690 695 700
 Asn Asn Gly Gln Thr Gln Leu Glu Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp
 20 705 710 715 720
 Leu Ile Asn Ala Lys Ala Met Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala
 725 730 735
 Lys Ile Glu Ala Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val
 740 745 750
 25 Asn Asn Asn Leu Asn Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr
 755 760 765
 Asn Leu Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe
 770 775 780

Asp Asn Glu His Pro Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr
 785 790 795 800
 Thr Leu Glu Gln Arg Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ser Ser Thr Ala
 805 810 815
 5 Tyr Asn Gln Ile Arg Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Lys Ala Ser
 820 825 830
 Ser Leu Ile Thr Lys Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Thr Leu Leu
 835 840 845
 Asp Ser Asn Glu Ile Thr Thr Ala Asn Lys Asn Ile Asn Asn Thr Leu
 10 850 855 860
 Ser Thr Ile Asn Glu Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser
 865 870 875 880
 Phe Ile Lys Lys Val Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr
 885 890 895
 15 Phe Thr Asn Ala Asn Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe
 900 905 910
 Ser Ala Asp Val Thr Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val
 915 920 925
 Trp Asn Gly Asp Glu Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser
 20 930 935 940
 Ile Thr Asp Val Ser Trp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys
 945 950 955 960
 Tyr Gln Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr
 965 970 975
 25 Phe Pro Tyr Lys Leu Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu
 980 985 990
 Gln Tyr Lys Leu Asn Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr
 995 1000 1005

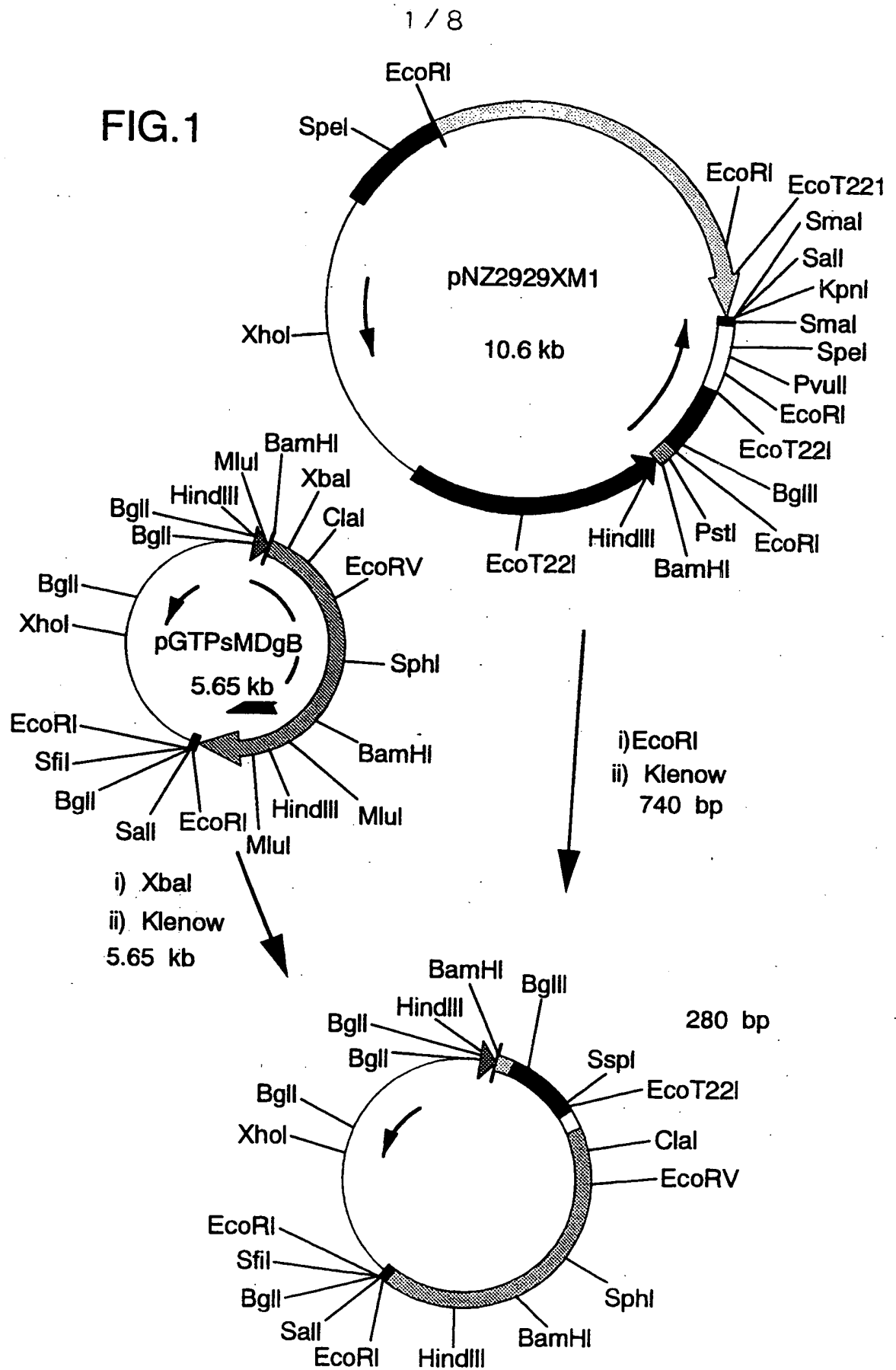
Ser Thr Ser Ala Asn Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp
1010 1015 1020
Glu Ile Lys Val Ala Lys Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln
1025 1030 1035 1040
5 Asn Thr Ile Glu Leu Ser Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys
1045 1050 1055
Val Ala Pro Met Ile Gly Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn
1060 1065 1070
Ala Asp Lys Ile Pro Gly Tyr Arg Arg Pro Gly Thr Phe Leu ***
10 1075 1080 1085

請 求 の 範 囲

1. マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を有するポリペプチドとヘル
ペスウイルスの外膜タンパク質由来のポリペプチドとを含む融合タンパク質であ
5 って、外膜タンパク質由来のポリペプチドがマイコプラズマ・ガリセプティカム
の抗原性を有するポリペプチドのN末端側に連結していることを特徴とする融合
タンパク質。
2. 外膜タンパク質が、鳥類に感染性を示すヘルペスウイルス由来である請求
項 1 記載の融合タンパク質。
- 10 3. 外膜タンパク質が、マレック病ウイルス由来である請求項 2 記載の融合タ
ンパク質。
4. 外膜タンパク質が、マレック病ウイルス由来 g B タンパク質である請求項
3 記載の融合タンパク質。
5. 外膜タンパク質由来のポリペプチドが、ヘルペスウイルス由来の膜タンパ
15 ク質のシグナル配列部分である請求項 1 記載の融合タンパク質。
6. 外膜タンパク質が、鳥類に感染性を示すヘルペスウイルス由来の膜タンパ
ク質のシグナル配列部分である請求項 5 記載の融合タンパク質。
7. シグナル配列部分が、マレック病ウイルスの外膜タンパク質由来のシグナ
ル配列部分である請求項 5 記載の融合タンパク質。
- 20 8. 外膜タンパク質由来のポリペプチドが、マレック病ウイルス由来の g B タ
ンパク質のシグナル配列部分である請求項 5 記載の融合タンパク質。
9. 請求項 1 ～ 8 記載の融合タンパク質をコードするハイブリッド DNA。
10. 請求項 1 ～ 8 記載の融合タンパク質をコードする DNA を組み込んだ組み
換えベクター。
- 25 11. 請求項 1 ～ 8 記載の融合タンパク質をコードする DNA を組み込んだ組み
換えアビボックスウイルス。
12. 請求項 1 ～ 8 記載の融合タンパク質をコードする DNA を組み込んだ組み
換えアビボックスウイルスを有効成分とした抗家禽マイコプラズマガリセプティ
カム感染症用組み換え生ワクチン。

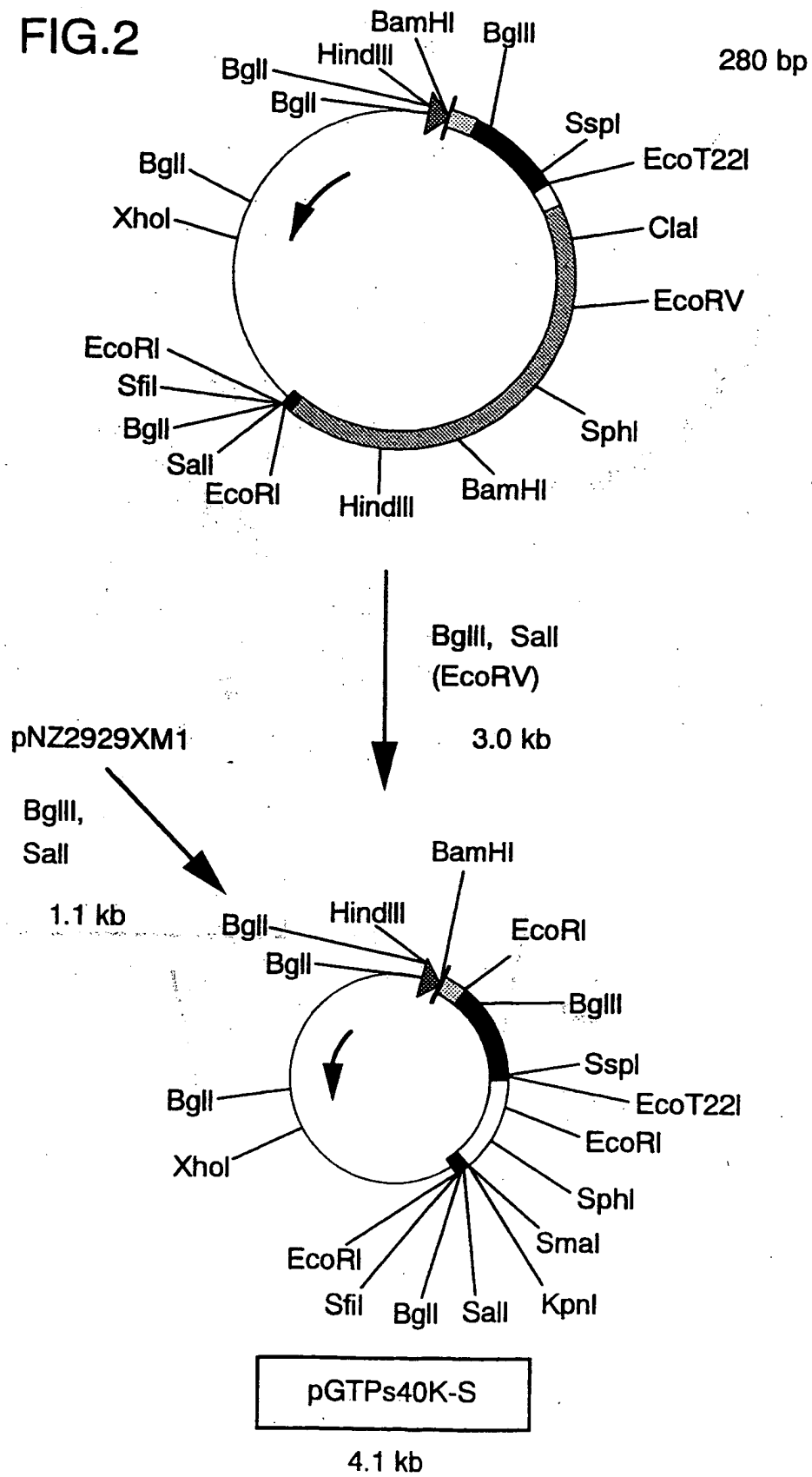
13. 請求項3または4記載の融合タンパク質をコードするDNAを組み込んだ組み換えアビポックスウイルスを有効成分として抗家禽マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症、および抗マレック病感染症用組み換え三価生ワクチン。

FIG. 1



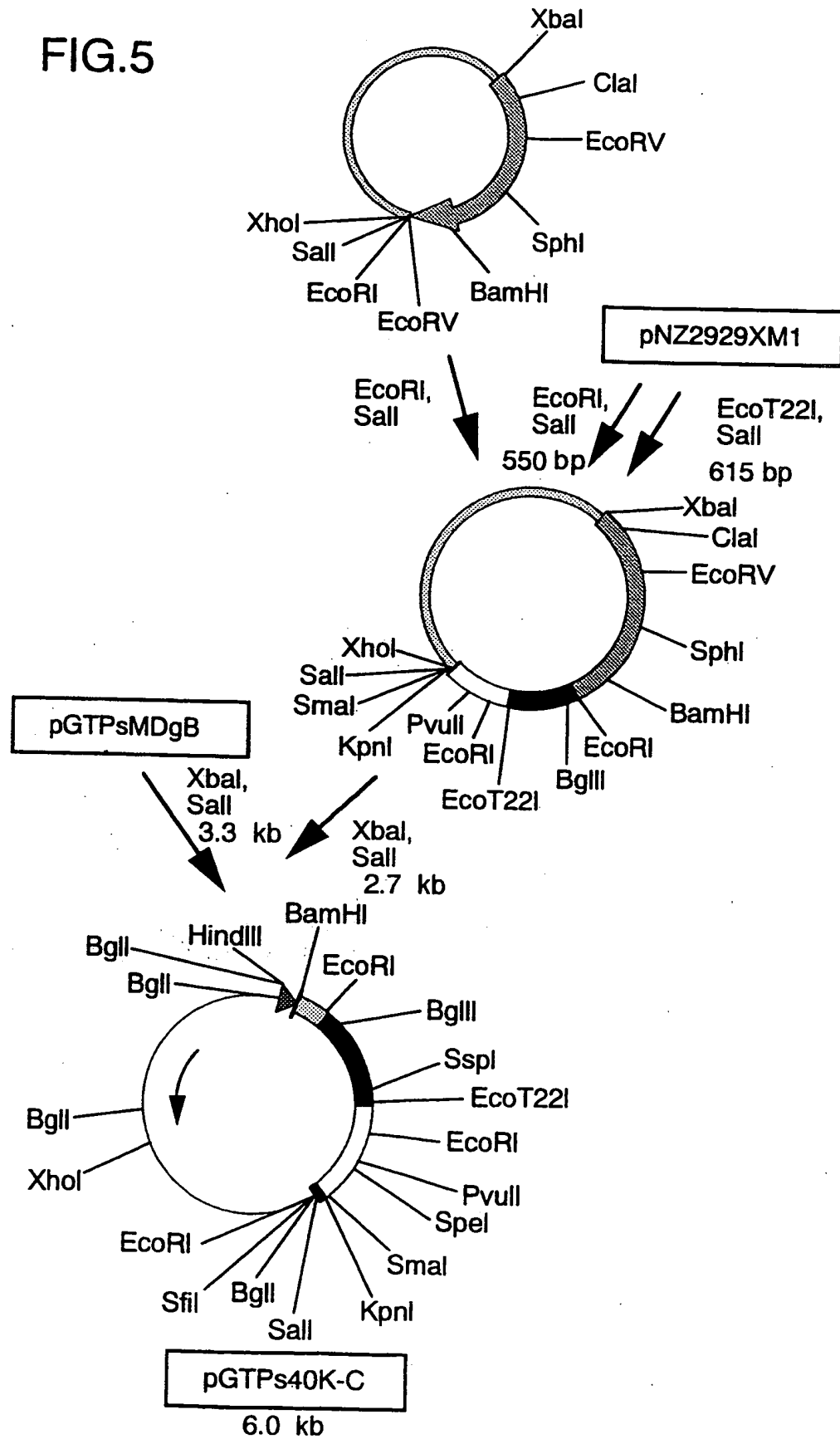
2 / 8

FIG.2



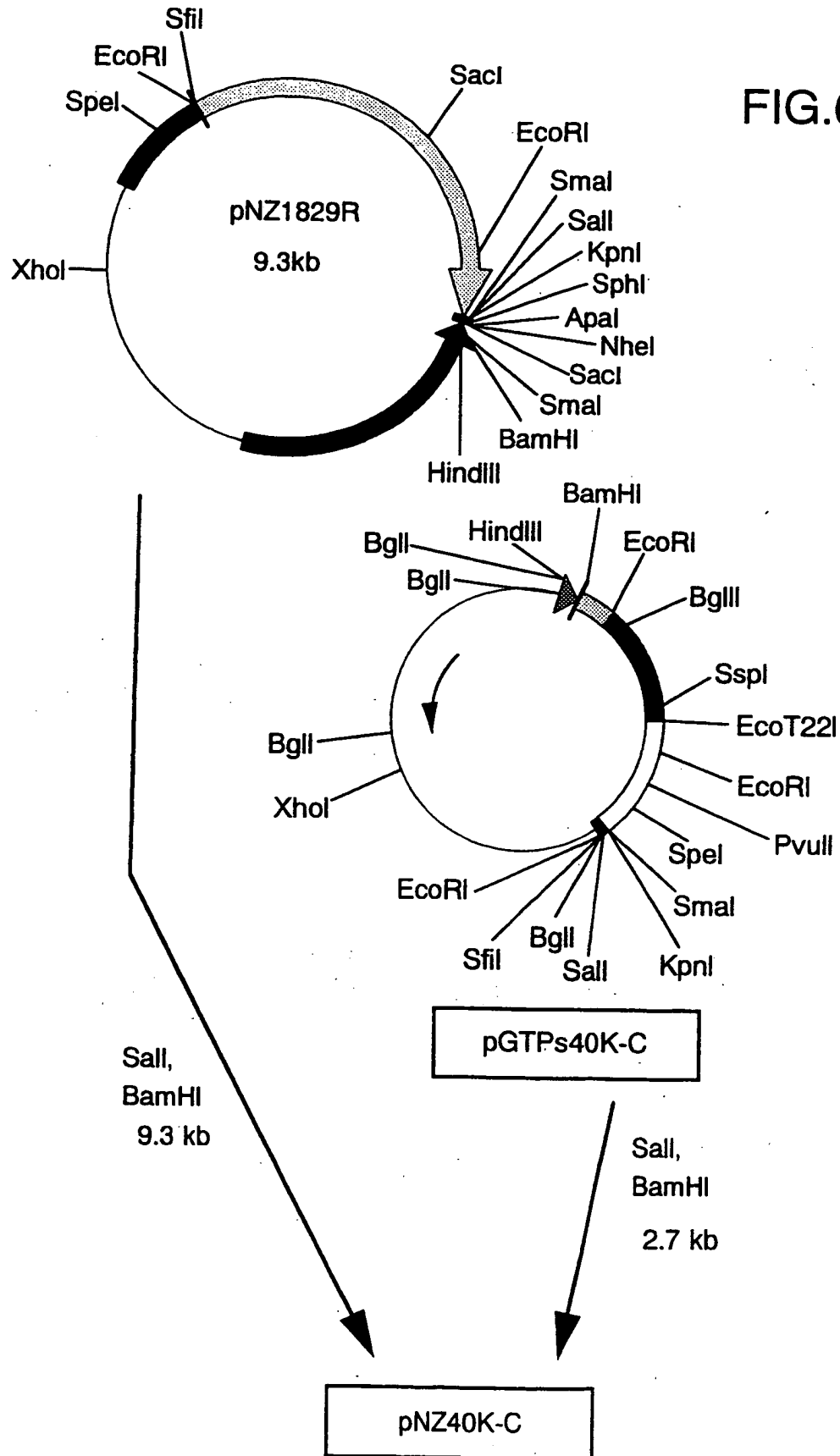
5 / 8

FIG.5



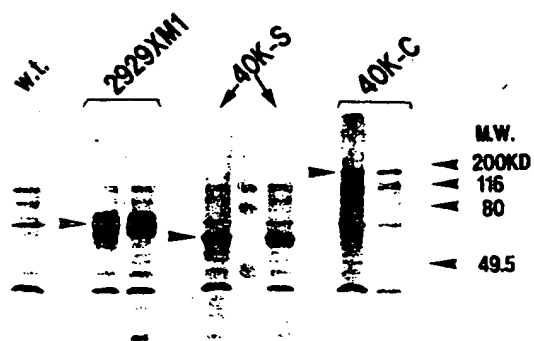
6 / 8

FIG.6



7/8

FIG.7



8/8

FIG.8

